

## ТЕСТ-СИСТЕМА «АБ-АНА» ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ АНАЭРОБНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ХИРУРГИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ

Окулич В.К., Федянин С.Д., Коваленко А.А., Шилин В.Е.,  
Чередняк А.Н., Мацкевич Е.Л.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов  
медицинский университет»,  
РНПЦ «Инфекция в хирургии»

**Введение.** Анаэробные микроорганизмы в настоящее время занимают одно из ведущих мест в этиологической структуре хирургических инфекций. В развитии гнойно-септических процессов у человека среди анаэробной микрофлоры преобладают *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Prevotella spp.* [2, 3, 5]. По современным представлениям, примерно в 81,52% случаев инфекции в хирургии смешанные аэробно-анаэробные [1, 2, 3, 4, 5]. При проведении мониторинга антибиотикоустойчивости анаэробов, при тяжёлых состояниях возникает необходимость определения чувствительности анаэробов к антибиотикам. Импортные тест-системы для этих целей весьма дорогостоящие. Так определение чувствительности одного штамма к антибиотикам обходится примерно в 4 доллара США. В связи с этим встаёт вопрос необходимости разработки тест-систем отечественного производства для определения чувствительности анаэробов к антибиотикам

**Цель исследования:** разработать тест-систему для определения чувствительности анаэробных микроорганизмов к антибиотикам

**Результаты и обсуждение.** Нами разработана тест-система «АБ-АНА» для определения чувствительности анаэробных микроорганизмов к антибиотикам

Планшет содержит 96 лунок (12 колонок и 8 рядов, по 2 ряда - 24 лунки для определения чувствительности одного штамма микроорганизма) Всего планшет позволяет определять чувствительность к 12 антибиотикам четырех штаммов микроорганизмов. Последняя лунка каждого четного ряда не содержит антибиотика и служит для определения положительного контрольного роста. Остальные 23 лунки содержат антибиотик в  $2^x$  пороговых концентрациях, исключая тикарциллин. В лунках планшета содержатся антибиотики в следующих концентрациях (в мкг/мл или г/л после внесения питательной среды): пенициллин – 0,5-2; амоксициллин + клавуланат – 4-8; тикарциллин + клавуланат – 32-64; цефокситин – 16-32, имипенем – 4-8; меропенем – 4-8; клиндамицин – 2-4; хлорамфеникол – 8-16; метронидазол – 8-16; моксифлоксацин – 2-8; амоксициллин – 2-4, тикарциллин – 32. Комплектация тест-системы: планшет с антибиотиками – 1 шт.; питательная среда АБ-АНА – 4 флакона; стерильный раствор хлорида натрия с массовой долей 0,9% в ампуле по 5 мл – 4 шт.; наконечники стерильные для автоматических дозаторов вместимостью 200 мкл – 4 шт.; стандартный образец оптической плотности 0,5 оптических единиц (McFarland) – 1 шт. (по заказу на все наборы).

### 1.1.1. Постановка опыта:

Приготовить взвесь бактерий Для этого бактериологической петлей внести одну или более колоний бактерий, выращенных в течение 24-48 ч при 37<sup>0</sup>С на среде для анаэробных бактерий, например, Шедлера в ампулу (флакон) с 2 мл стерильного раствора хлорида натрия с массовой долей 0,9%. Оптическая

плотность взвеси в пробирке после внесения микроорганизма должна соответствовать 0,5 оптических единиц (McFarland). Этого можно достичь путем:

- измерения на денситометре или на спектрофотометре при длине волны 550 нм - 0,125 OD (составляет  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл);
- сравнения со стандартом оптической плотности 0,5 оптических единиц (McFarland).

Перенести в ампулу с питательной средой АБ-АНА 5 мкл приготовленной взвеси бактерий и тщательно перемешать. Внести в каждую лунку планшета по 135 мкл питательной среды АБ-АНА с микроорганизмами ( $\approx 10^6$  КОЕ/мл). Планшет накрыть крышкой. Инкубировать 24-48 ч при 37°C в термостате в анаэробных условиях. Учет результатов: Визуальный учет:

## 2. Для антибиотиков, представленных в двух концентрациях

Визуальный учет		Результат		Исследуемые штаммы	
1 <sup>-я</sup> конц	2 <sup>-я</sup> конц	с	С		
прозрачная	О прозрачная	-	-	Ч (S)	Чувствительный
мутная	О прозрачная	+	-	П (P)	Промежуточный
мутная	● мутная	+	+	Р (R)	Резистентный

## 3 Для антибиотиков, представленных в одной концентрации

Визуальный учет	Результат	Исследуемый штамм	
○ прозрачная	-	Ч (S)	Чувствительный
● мутная	+	Р (R)	Резистентный

Ч (S)	При отсутствии роста в лунках с 1 <sup>-й</sup> и 2 <sup>-ой</sup> концентрацией антибиотика штамм чувствителен
П (I)	При наличии роста в лунке с 1 <sup>-й</sup> концентрацией, но отсутствии в лунке со 2 <sup>-ой</sup> концентрацией штамм обладает промежуточной чувствительностью
Р (R)	При наличии роста в лунках с 1 <sup>-й</sup> и 2 <sup>-ой</sup> концентрацией, штамм считать устойчивым

Инструментальный учет проводят на иммуноферментном анализаторе АИФ Ф300 - мультиканале с помощью программного обеспечения «Sensitiv» (зарегистрировано в Национальном центре интеллектуальной собственности № 106 от 05.10.2009 г.) Положительным считается результат при оптической плотности  $\geq 0.4$  OD, а отрицательным  $< 0.23$  OD.

«Серая зона» располагается в интервале  $< 0.4 \geq 0.23$  – тест считается спорным и требуется для учета визуальное подтверждение. При отсутствии роста в контрольной лунке – тест считается недействительным, и его необходимо повторить. При использовании разработанной тест-системы стоимость определения чувствительности одного штамма составляет примерно 1 доллар США без учета культивирования в анаэробных условиях.

**Выводы.** Таким образом, разработана тест-система «АБ-АНА» для определения чувствительности анаэробов к антибиотикам, которая характеризуется простотой в изготовлении, диагностической специфичностью  $\pm 10\%$  в сравнении референс-методом, и может найти широкое применение в бактериологических лабораториях различного профиля.

Литература:

1. Антибактериальная терапия в гнойной хирургии: Руководство / Под ред. А. Н. Косинца. – Витебск: ВГМУ, 2002. – 600 с.
2. Косинец А. Н., Стручков Ю. В. Инфекция в хирургии: Руководство – Витебск: ВГМУ, 2004. – 510 с.
3. Стручков В. И., Гостишев В. К., Стручков Ю. В. Хирургические инфекции. – М., 1991. – 560 с.
4. Федянин С. Д. Рациональное использование антибактериальных препаратов в комплексном лечении хирургической инфекции: Автореф дис. канд. мед. наук. – Смоленск, 2006. – 20 с.
5. Хирургические инфекции: Руководство / Под ред. И. А. Ерюхина, Б. Р. Гельфанда, С. А. Шляпникова. – СПб.: Питер, 2003. – 864 с.